

Versuche über das Wesen der Anaphylaxie.

Von

Emil Abderhalden und Arthur Weil.

Mit 1 Tafel.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Halle a. S.)
(Der Redaktion zugegangen am 9. März 1920.)

Trotz ungezählter Versuche ist die Ursache der Anaphylaxie und des anaphylaktischen Shockes bis heute nicht so aufgeklärt, daß eine bestimmte Ansicht an die Stelle zahlreicher verschiedener Anschauungen treten könnte. Auf der einen Seite vertritt Friedberger mit seinen Schülern und Anhängern die außerordentlich bestechende Ansicht, daß die Anaphylaxie bzw. der anaphylaktische Shock auf die Bildung eines besonderen Körpers, genannt Anaphylatoxin, zurückzuführen sei. Er stellt sich vor, daß nach Einspritzung von blutfremdem Eiweiß ein Abbau einsetzt, der zu Abbaustufen führt, die durch ganz spezifische, eigenartige Eigenschaften ausgezeichnet sind. Diese Anschauung schien eine mächtige Stütze durch die Entdeckung der Abwehrfermente zu erhalten, und der eine von uns hat sofort das Studium der Anaphylaxie von den erwähnten Gesichtspunkten aus aufgenommen in der Hoffnung, zeigen zu können, daß die Entstehung der Abwehrfermente und ihre Wirkung mit der Anaphylaxie in bestimmtem Zusammenhang stehen¹⁾. Die betreffenden, vielfach wieder-

¹⁾ Vgl. die Literatur bei Emil Abderhalden, Abwehrfermente. 4. Auflage. J. Springer (1914). — Vgl. insbesondere Emil Abderhalden, Diese Zeitschr. Bd. 82, S. 109 (1912).

holten Untersuchungen ergaben jedoch keinen Anhaltspunkt für die Entstehung des Shockes. Es zeigte sich, daß bereits am 2. bis 3. Tage nach der Einspritzung des Eiweißes Abwehrfermente im Blute anzutreffen sind, und trotzdem kommt es bei der Reinjektion derselben Eiweißart, wie sie zur Vorbehandlung benutzt worden war, nicht zur Erscheinung des Shockes. Der Gehalt des Blutes an Abwehrfermenten wurde verfolgt bis zu dem Tage, an dem der Shock sich auslösen ließ. Es zeigte sich kein bemerkenswerter Unterschied im Abbauvermögen des Blutserums während dieser ganzen Zeit. Selbstverständlich spricht dieser ganze Befund nicht unmittelbar gegen die Anschauung von Friedberger. Es konnte nur der Schluß gezogen werden, daß eine Stütze für die Annahme von Friedberger aus den erwähnten Beobachtungen nicht gezogen werden kann.

Eine andere Ansicht vertritt Dörr. Ihm hat sich in neuerer Zeit Paul Schmidt¹⁾ angeschlossen. Diese Forscher sind der Ansicht, daß die eigenartigen Erscheinungen, die der Reinjektion des blutfremden Eiweißes folgen, auf physikalischen Zustandsänderungen von kolloiden Produkten des Blutplasmas beruhen. Sie sollen auch die Ursache der in den Blutkapillaren festgestellten Gerinnungserscheinungen sein. Auch diese Annahme vermag uns jedoch nicht zu erklären, weshalb erst nach einer bestimmten Zeit der Zustand des Shockes ausgelöst werden kann. Es ist nicht unsere Absicht, auf das so außerordentlich mannigfaltige Forschungsgebiet der Anaphylaxie hier einzugehen. Es liegen eine große Anzahl der verschiedensten Beobachtungen vor, die zeigen, daß das ganze Problem vielfach gar zu einseitig betrachtet worden ist. Die Auslösung des Shockes kann durch allerlei Maßnahmen verhindert werden. Schon dieser Umstand zeigt, daß es sich nicht nur um die Bildung eines bestimmten Stoffes handeln kann, vielmehr

¹⁾ P. Schmidt, Archiv f. Hygiene u. Infektionskr. Bd. 83, S. 89 (1916); P. Schmidt und W. Schürmann ebenda Bd. 86, S. 195 (1919). — Vgl. zum ganzen Problem auch Hermann Dold, Archiv f. Hygiene Bd. 89 S. 101 (1919).

müssen noch andere Bedingungen erfüllt sein, um die schweren Erscheinungen des Shockes herbeizuführen. Es ist selbstverständlich nicht ausgeschlossen, daß chemische und physikalisch-chemische Momente zusammenwirken. Besonders bedeutungsvoll ist die Beobachtung von Paul Schmidt¹⁾, wonach die Möglichkeit besteht, auch dann die typische Erscheinung des Shockes hervorzurufen, wenn nicht Eiweiß, sondern vollständig eiweißfreie Stärke in die Blutbahn eingeführt wird. Es besteht nämlich auch hier die Möglichkeit der Bildung eines Abbauproduktes, das seinerseits wieder auf den Zustand von kolloiden Substanzen im Blut einwirken könnte. Es muß aber auch die Möglichkeit zugegeben werden, daß eine direkte Zustandsänderung durch die reinjizierte Stärke statt hat.

Wir stellten uns folgende Aufgabe: Es sollte eine Aminosäurekette durch immer weitere Anlagerung eines neuen Eiweißbausteines vergrößert werden. Wir bezweckten damit die Herstellung immer höher molekularer Polypeptide von ganz bestimmter Struktur. Wir begannen unsere Versuche mit der Aminosäure Glykokoll und bauten mit diesem Bausteine die Polypeptide Glycyl-glycin, Diglycyl-glycin, Triglycyl-glycin, Tetra-, Penta-, Hexa- und Heptaglycyl-glycin auf. Die Fragestellung war die folgende: Gelingt es, mit einem dieser Produkte Anaphylaxie und speziell den Shockzustand hervorzurufen?

Unsere Absicht war, sobald nach der Injektion und der Reinjektion eines bestimmten Polypeptides der Shockzustand auftrat, festzustellen, in welchem Zustand das betreffende Produkt im Blutplasma vorhanden war. Ferner beabsichtigten wir, ganz genaue physikalisch-chemische Studien über das Verhalten des betreffenden Produktes zu den Plasma-eiweißkörpern und auch den Blutkörperchen zu machen, um mit allen Methoden der physikalisch-chemischen Technik herauszufinden, welcher Art der Einfluß des betreffenden Polypeptides auf den Gehalt des Blutes war. Der eine von

¹⁾ Siehe die Anmerkung auf voriger Seite.

uns¹⁾ hat bereits früher mit hochmolekularen Polypeptiden vorläufige Versuche dieser Art durchgeführt. Das Ergebnis war kein ganz eindeutiges. Aus Mangel an Material konnten die Versuche damals nicht wiederholt werden.

Was die Versuchstechnik anbetrifft, so sei erwähnt, daß wir die einzelnen Produkte in Dosen von 0,1 g subkutan oder intraperitoneal zugeführt haben. Die intravenöse Injektion ist zu derartigen Versuchen nicht geeignet, weil die Möglichkeit physikalischer Zustandsänderungen im Blut und dadurch bedingte Thrombenbildung in den feinsten Kapillaren vorliegt. Nur das bei der erwähnten Art der Zuführung eintretende klassische Bild des Shockzustandes mit Temperatursturz und Lungenblähung darf als Anaphylaxie angesprochen werden.

Nach der erwähnten Veröffentlichung über den Plan, in systematischer Weise die Möglichkeit der Erzeugung von Anaphylaxie durch peritoneale Einführung von Polypeptiden von bekannter Zusammensetzung und Struktur zu untersuchen, hat Zunz²⁾ in der gleichen Richtung Versuche angestellt. Wir konnten leider seine Versuchsanordnung nicht einsehen, weil die Zeitschrift, in der er seine Arbeit mitgeteilt hat, uns trotz aller Bemühungen nicht zugänglich war. Er gibt an, daß schon nach Einspritzung von Triglycyl-glycin anaphylaxieähnliche Erscheinungen aufgetreten seien. Wir fanden hingegen bei der Einspritzung aller Polypeptide bis herauf zum Octapeptid, abgesehen von geringer Temperaturschwankung (0,8–1,3°), keine Erscheinungen, die an den anaphylaktischen Shock erinnerten. Die Reinjektion wurde jedesmal nach 20 Tagen vorgenommen, und zwar wurden Mengen von 0,006–0,1 g Polypeptid zugeführt.

Interessanterweise beobachteten wir, daß vom Heptapeptid an nach der ersten Injektion eine charakteristische Hauterkrankung eintrat, die wir mit demselben Präparat immer wieder an derselben Stelle hervorrufen konnten. Drei

¹⁾ Abderhalden, Diese Zeitschr. Bd. 81, S. 315 (1912).

²⁾ Journal de Physiolog. et de Pathol. génér. Bd. 18, S. 449 (1918).

Tage nach der intraperitonealen Injektion von 0,1 g Hexaglycyl-glycin begann sich die Haut zu beiden Seiten der Wirbelsäule in der Höhe der Kreuzwirbel stark zu röten, gegen die Umgebung zu erwärmen und Haarausfall zu zeigen. Nach weiteren 2 Tagen hatte die Epidermis sich in trockenen Borken abzulösen begonnen; unter den Schorfbildungen sah man einzelne dunkelrote nekrotische Herde. Die Erkrankung trat symmetrisch zu beiden Seiten der Wirbelsäule auf, und zwar in zwei parallelen Streifen von 4—5 cm Länge und 2,5—3 cm Breite (Tafel 1). Das Körpergewicht nahm im Vergleich zu den Kontrolltieren um etwa 15% im Durchschnitt ab. Nach etwa 4 Wochen waren die Borken abgestoßen; die Haut an der erkrankten Stelle war haarlos und mit einem mattseidglänzenden Häutchen bedeckt, in das einzelne dunkelrote Flecke von Erbsengröße eingelagert waren (Tafel 2). Nach weiteren 2—3 Wochen begann wieder die Haarbildung die kahlen Stellen zu bedecken (Tafel 3). Mikroskopische Hautschnitte, die 8 Tage nach der Injektion angefertigt waren, zeigten, daß an den erkrankten Stellen die Epidermis in der äußersten Schicht, dem Stratum corneum, verschwunden und das Bindegewebe des Coriums im Vergleich zu normalen Präparaten vermehrt war.

Diese eigenartige, eng umschriebene Hauterkrankung kann als eine vorübergehende Ernährungsstörung gedeutet werden, die durch Veränderungen im kapillaren Kreislauf an den erkrankten Stellen bedingt ist. Der Angriffspunkt für die toxische Wirkung des Polypeptides muß innerhalb der Bauchhöhle gelegen sein, da die subkutane Injektion keine Veränderungen bewirkt. In Analogie mit besser studierten Verhältnissen am menschlichen Körper kann man annehmen, daß auch beim Meerschweinchen das in Frage kommende Hautgebiet durch die Rami sacrales der Arteria sacralis media versorgt wird. Diese beiden paarigen Äste werden von Nerven innerviert, die von den Bauchgeflechten des Sympathicus ausgehen. Es besteht die Möglichkeit, daß bei intraperitonealer Injektion eine direkte Schädigung dieser Zentren durch das Heptapeptid erfolgt ist. Unerklärt bleibt allerdings, weshalb

nicht auch andere Gefäßgebiete, z. B. die des Darmkanals, in Mitleidenschaft gezogen worden sind.

Hollande beschreibt nach intraperitonealer Injektion von Glykokollkupfer anaphylaktische Erscheinungen bei Meerschweinchen. Sie gingen nach der dritten oder vierten Injektion im Shock zugrunde, während bei intrakardialer Einspritzung keine Schädigungen auftraten¹⁾. Daß es sich hierbei nicht, wie er annimmt, um toxische Wirkungen, die durch mehr als eine Aminogruppe im Molekül bedingt sind, handelt, sondern um charakteristische Kupfervergiftungen, konnten wir durch die intraperitoneale Injektion von Glykokollkupfer und Kupferacetat in Mengen, die 3,1 mg Kupfer enthielten, beweisen. 11,4 mg Glykokollkupfer einem Meerschweinchen von 623 g und 9,9 mg Kupferacetat einem Tiere von 638 g Gewicht intraperitoneal injiziert, riefen die gleichen Erscheinungen hervor: Etwa 5 Minuten nach der Einspritzung zeigen die Tiere leichte Unruhe; es treten starke klonische Krämpfe der Rumpfmuskulatur auf, die etwa 20 Minuten andauern und von einem Stadium der Erschöpfung gefolgt werden; unter zunehmender Atemnot tritt nach 4 Stunden der Tod ein. Die Körpertemperatur ist nach 1 Stunde um 4,5° gesunken und beträgt vor dem Exitus nur noch 31°—32°. Die Sektion ergab in beiden Fällen starke Hyperämie des Bauchfelles und der Därme, die aufgetrieben sind; die Lungen sind nicht retrahiert, dagegen hepatisiert. Das Volumen beträgt im ersten Falle 12 ccm, nach Kupferacetat 11 ccm gegen 8—9 ccm bei einem normalen Meerschweinchen.

Experimenteller Teil.

1. Darstellung der Glykokoll enthaltenden Polypeptide.

Die Derivate der Glycylreihe sind bis zum Hexapeptid bereits von Emil Fischer und seinen Mitarbeitern dargestellt worden. Abweichend von den angeführten Methoden²⁾

¹⁾ C. r. de biologie Bd. 81, S. 58 (1918); vgl. Chem. Zentralbl. Bd. I, S. 250 (1919).

²⁾ Vgl. Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine. Berlin 1906.

stellten wir das Pentaglycyl-glycin nicht aus dem Diglycyl-glycin-methylester durch Erhitzen auf 100° dar, sondern aus dem Pentapeptid durch Anlagerung von Chloracetylchlorid. — Als Ausgangsmaterial benutzten wir Monochloressigsäure, aus dem wir Glykokollesterchlorhydrat in größeren Mengen nach der folgenden Methode gewannen:

Glykokollesterchlorhydrat.

100 g Monochloressigsäure in 400 ccm Wasser gelöst tropfen allmählich unter Rühren und stetem Eiszusatz in $1\frac{1}{4}$ Liter 25%iges Ammoniak; die Lösung wird 8 Tage bei Zimmertemperatur und hellem Tageslicht aufbewahrt. Hierauf wird sie im Vakuum auf etwa 500 ccm eingeengt und in einem Emailtopf zum Sieden erhitzt, dann so lange Calciumoxyd hinzugesetzt, bis die stürmische Ammoniakentwicklung aufhört, hierauf Zusatz von verdünnter Schwefelsäure bis keine Fällung mehr eintritt, Einengen des Filtrats im Vakuum bis zur Trockne, Einleiten von trockenem Salzsäuregas unter Zusatz von 500 ccm absolutem Alkohol. Wieder bei 30° im Vakuum zur Trockne einengen und die Veresterung mit 300 ccm unter schnellem Einleiten von HCl wiederholen; nach dem Absaugen der noch heißen Lösung von dem Rückstande fällt in der Kälte das Glykokollesterchlorhydrat aus. Ausbeute etwa 30—35% der Theorie.

Aus dem Glykokollesterchlorhydrat wurde Glycinanhydrid durch Auflösen in wenig Wasser und Zusatz von 33%iger Natronlauge unter Turbinieren und starker Kühlung im Kältemisch gewonnen. — Die Verarbeitung zu Diglycyl-glycin geschah nach den schon früher gegebenen Vorschriften¹⁾.

Bei der Darstellung des Triglycyl-glycins wichen wir von der Fischerschen Methode ab, indem wir das Chloracetyldiglycyl-glycin nicht bei 100° , sondern bei Zimmertemperatur aminierten, wobei wir mit der 10fachen Menge in Eis gesättigtem Ammoniakwasser in Druckflaschen 5 Tage lang aufbewahrten. Nach dieser Zeit waren etwa 80% des gesamten

¹⁾ E. Abderhalden und A. Fodor, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 49, S. 561 (1916).

Chlors abgespalten. — Die Ausbeute an reinem Tetrapeptid beträgt nach dieser Methode etwa 60% der Theorie, wenn man nicht mit Alkohol fällt, sondern das Polypeptid durch Einengen der ammoniakalischen Lösung im Vakuum gewinnt. Das hierbei erhaltene Produkt ist beim Trocknen im Vakuum-exikkator über Schwefelsäure leicht wasserfrei zu erhalten und behält keine 2–5% Wasser zurück, wie es Fischer beschreibt¹⁾.

Dieselbe Methode wurde bei der Darstellung der folgenden Glieder angewandt; vom Chloracetyltriglycyl-glycin an ist es hierbei nötig, zunächst nach dem Zusatz des Ammoniaks 24 Stunden auf 37° zu erwärmen. — Die maximal abgespaltene Menge Cl nimmt bei den höheren Gliedern immer mehr ab; bei der Darstellung des Pentapeptides beträgt sie etwa 60% der Theorie, beim Hexapeptid 40%, beim Heptapeptid 20%, beim Oktapeptid ca. 15%. Es ist bis jetzt nicht geglückt, aus den Mutterlaugen der beim Einengen ausgefallenen Polypeptide weitere Chloracetylierungsprodukte zu gewinnen; sie stellen neue, leicht wasserlösliche Verbindungen dar. — Da die Löslichkeit mit der Länge der Kette stark abnimmt, wird die Reinigung durch einfaches Umkristallisieren aus Wasser immer mehr erschwert. Wir mußten sie schließlich durch Auflösen in Ammoniak oder verdünnter Natronlauge und Neutralisieren mit verdünnter Säure bewerkstelligen. — Die physikalischen Konstanten der dargestellten Verbindungen sind in einer Tabelle (S. 9) zusammengestellt.

Als analytische Belege für die neuen Polypeptide führen wir an:

1. Pentaglycyl-glycin: 0,0717 g Substanz geben 0,1053 g CO₂ und 0,0388 g H₂O. 0,1026 g Substanz verbrauchen 16,8 ccm n/10 H₂SO₄.
Ber. für C₁₂H₂₀N₆O₇: C: 39,98% H: 5,61% N: 23,34%
Gef.: C: 40,12% H: 6,06% N: 22,95%
2. Heptapeptid: 0,1556 g Substanz geben 0,2268 g CO₂O und 0,0801 g H₂O.
Ber. für C₁₄H₂₃N₇O₈: C: 40,26% H: 5,56%
Gef.: C: 39,75% H: 5,76%

¹⁾ l. c. S. 353.

Substanz	F (unkorr.)		Löslichkeit in Wasser	
	Bräunung Beginn	Zersetzung gegen	15°	100°
			1 Teil in	
Diglycyl-glycin . .	215	240	20	leicht
Triglycyl-glycin . .	220	270 ¹⁾	50	4
Tetraglycyl-glycin . .	252	270	700	60
Pentaglycyl-glycin . .	258	280	2000	200
Hexaglycyl-glycin . .	220 ²⁾	285	—	—

2. Anaphylaxie-Versuche.

Zur intraperitonealen Injektion wurden die Polypeptide in der berechneten n/5—n/10-Natronlauge aufgelöst, wieder mit der äquinormalen Menge Schwefelsäure neutralisiert und mit einer gut ausgekochten 2 ccm-Spritze langsam eingespritzt. — Das Hexa- und Heptapeptid fielen beim Neutralisieren der alkalischen Lösung als gelatinöse Masse aus und wurden mit 2—3 ccm Wasser wieder verrieben.

¹⁾ Die Glycylderivate zeigen keine charakteristischen Schmelz- oder Zeretzungspunkte. Die Bräunung beginnt uncharf nach leichter Gelbfärbung; es tritt dann allmählich dunklere Färbung ohne deutliche Zersetzung ein. Die Zahlen der zweiten Spalte bedeuten daher maximale Schwarzfärbung.

²⁾ Beginnende Gelbfärbung.

Abbildung 1.
Meerschweinchen I. 24. XI. 1919.



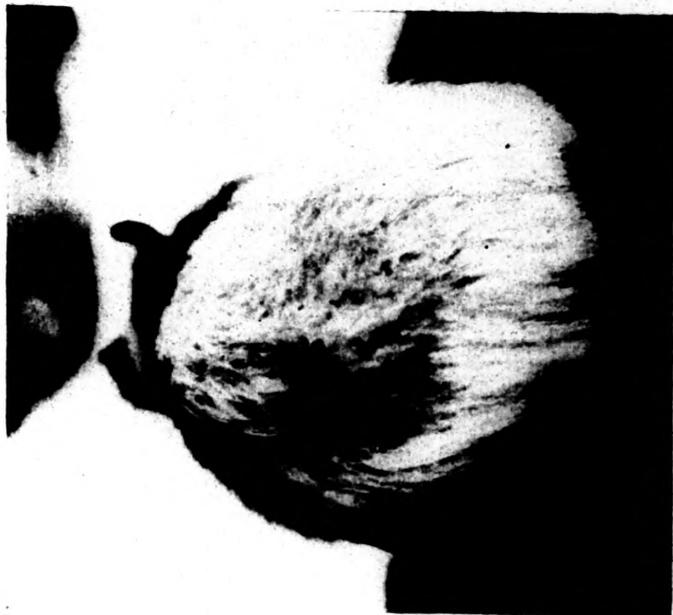
20 Tage nach der Injektion von 0,1 g
Hexaglycyl-glycin. Gewicht: 480 g.
[Gewichtsabnahme 63 g.]

Abbildung 2.
Meerschweinchen I. 3. XII. 1919.



30 Tage nach der Injektion.
Gewicht 485 g.

Abbildung 3.
Meerschweinchen V. 18. II. 1920.



38 Tage nach der Injektion von 0,1 g Hepta-
glycyl-glycin. Gewicht 470 g. [Gewichtsab-
nahme nach 5 Tagen 70 g, nach 38 Tagen 50 g.]

Versuche über das Wesen der Anaphylaxie.